

激动素在西葫芦子叶的花芽构建过程中 促成的生理生化变化

黄作喜^{1,2}, 卿东红¹, 段辉国¹, 唐正义¹, 王 芳¹

(1 内江师范学院化学与生命科学系, 四川内江 641112; 2 内江师范学院花卉研究所, 四川内江 641112)

摘要: 报道了在激动素的影响下离体培养的西葫芦 (*Cucurbita pepo L.*) 子叶的生理生化变异及花芽的构建。结果如下: 在附加有激动素 (KT) $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MS 培养基培养的西葫芦子叶中花芽的发生率占 46%, 而对照组中仅达到 5%。在花芽的构建过程中子叶内在的可溶蛋白, 可溶糖, RNA 和 POD 活性明显高于对照组; 亚精胺 (Spd) 和腐胺 (Put) 的比值 (Spd Put) 高于对照组的 2 倍; 淀粉和 DNA 的含量与对照组无大的区别, 但是二氨基丙烷 (DAP) 和尸胺 (Cad) 却明显下降了。由此可见在激动素影响下子叶出现的生理生化指数变化促进了花芽的构建。

关键词: 西葫芦; 花芽构建; 激动素; 多胺

中图分类号: Q 945 文献标识码: A 文章编号: 0253-2700(2005)06-0663-06

Effect of Kinetin (KT) on Physiological and Biochemical Variation of Cotyledons of *Cucurbita pepo* in Vitro during Construction of Floral Buds

HUANG Zuo-Xi^{1,2}, QING Dong-Hong¹, DUAN Hui-Guo¹,
TANG Zheng-Yi¹, WANG Fang¹

(1 Department of Chemistry and Life Science, Neijiang Teachers College, Neijiang 641112, China;

2 Flower Research Institute of Neijiang Teachers College, Neijiang 641112, China)

Abstract: Physiological and chemical variation and construction of floral buds of cotyledons of *Cucurbita pepo L.* induced by kinetin are reported in the present paper. The results demonstrated that differentiation in floral bud of the cotyledons which cultured on MS mixed with kinetin $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ accounted for 45% of the total, whereas only reached 5% in the control. During construction of the floral buds, the endogenous soluble protein, soluble sugar, RNA and POD activity of the cotyledons apparently exceeded those of the control; the ratio between Spd and Put (Spd Put) is two times more than that of the control; the content of starch and DNA are not quite different from the control, but DAP and Cad apparently decreased. It is easy to come to a conclusion that the variation of physiological and chemical induces in the

基金项目: 四川省教育厅自然基金重点项目“试管植物开花、座果研究体系的建立”(No.2003A164)

收稿日期: 2005-02-16, 2005-06-28 接受发表

作者简介: 黄作喜 (1966-) 男, 硕士, 四川省安岳县人, 内江师范学院化学与生命科学系、内江师范学院花卉研究所副研究员, 从事植物开发生理研究工作。

cotyledons *in vitro* induced by kinetin promoted the construction of floral buds.

Key words: *Cucurbita pepo*; Floral-bud construction; Kinetin; Polyamines

花芽分化是高等植物个体发育中最复杂的问题，与作物开花和结果即经济产量密切相关，弄清其规律性具有极为重要的理论和应用价值。薄层培养、子叶离体培养、枝离体培养等是重要的研究手段，最为多见的是子叶离体培养诱导成花研究，供试材料一般选择 5~6 d 龄的带下胚轴黄瓜子叶（Kaur-Sawhney 等，1988）。姜维梅等（1998）认为，黄瓜子叶离体培养 13~20 d 为花芽构建期。花芽构建是花芽分化的质变过程和最关键步骤，涉及成花基因转录与调控、特异酶（蛋白质）启动、开花营养物质富集与运送准备等生理生化过程，以及花结构分化与性别表达等形态发生过程。目前对花芽分化整体过程的研究已积累了部分材料和理论基础，但针对花芽构建的研究不多，特别是在外源信号导致内在生理生化连锁响应方面，远未弄清其规律，同时由于以往的实验材料多数使用黄瓜子叶，所得结论难免带有个性特征，人们一直在不断搜寻来自其它材料的实验证据。西葫芦种子来源便利，种子和子叶肥大、操作方便，花芽分化迅速、量多，我们已试验并成功建立了西葫芦子叶开花实验系统（黄作喜等，2001），发现其子叶离体培养 14~20 d 为花芽分化的形态建成期，并检测了子叶内源的 ZR_s、GA₁₃、ABA 的动态变化（黄作喜等，2002）。基于以上事实，有必要就 KT 刺激西葫芦子叶培养 14~20 d 间的核酸含量、蛋白质等营养基础、相关酶活性及胞内传递信号的“第二信使”PAs 含量进行跟踪测定，探讨外源激动素如何引起离体西葫芦子叶内在生理生化变化及其花芽构建的生理响应规律。与黄瓜子叶离体培养花芽分化研究互为参照，进一步揭示高等植物的花芽分化机理。

1 材料与方法

挑选山西太原产西葫芦（*Cucurbita pepo* L.）饱满健壮种子，剥去外种皮，用 0.1% HgCl₂ 消毒 5 min，蒸馏水清洗 4 次，再用无菌水浸泡 12 h，播种于灭菌后的 MS 培养基上。每天光照 14 h、2 000 lx，温度（24±2）。当种子萌发第一片真叶时（约 8 d 龄），剪取带 2 mm 下胚轴子叶接种于含 KT1.0 mg/L（单位下同）的 MS 培养基中，对照（CK）不含 KT，每个处理 20 片子叶，光照 14 h、2 000 lx，温度（24±2）。生根、萌芽、花芽出现、枯萎的时间分别是离体培养后第 6 d、14 d、20 d、26 d，营养芽和花芽均从子叶身与下胚轴间的关节点长出，不定根由下胚轴末端产生。KT1.0 处理的西葫芦子叶 20 d 时花芽分化率达 46%，而对照的花芽分化率仅 5%。剪取离体培养 14 d、17 d、20 d、23 d、26 d 的带下胚轴子叶各 1 g，低温冷藏备用。

采用薄层荧光法（李宗霆和周燮，1996）测定子叶内源 Spd、Put、DAP、Cad，用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定可溶性蛋白质含量。按蒽酮比色法测定可溶性糖的含量，取经提取可溶性糖后的残渣，加入 2% HCl 125 ml，沸水浴 1 h 左右，定容至 250 ml，过滤，取滤液按蒽酮比色法测定，计算淀粉含量。CN 为子叶内可溶性糖含量与可溶性蛋白质含量的比值。用比色法测定过氧化物酶（POD）活性。用紫外吸收法测定总核酸含量，用二苯胺显色法测定 DNA 含量，总核酸含量减去 DNA 含量即得 RNA 含量。实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 KT1.0 处理对西葫芦子叶花芽构建时可溶性糖、淀粉含量的影响

KT1.0 处理西葫芦子叶的淀粉含量在 14 d 至 20 d 与对照差异不显著，从 20 d 至 26 d 与

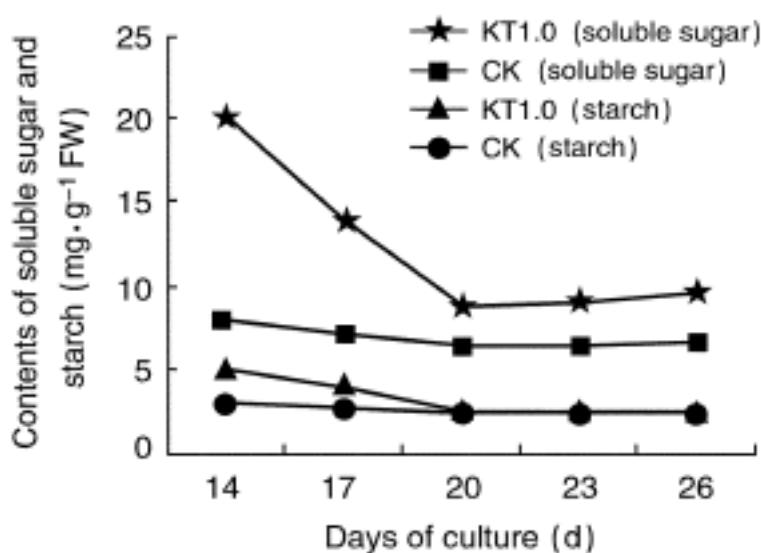


图 1 西葫芦子叶花芽构建时可溶性糖、淀粉含量的变化

Fig. 1 Changes of soluble sugar and starch of cotyledon of *Cucurbita pepo* during floral bud construction

14 d 至 20 d 在 0.05 水平与对照呈显著差异, 20 d 至 26 d 与对照无显著差异。对照和 KT1.0 处理的西葫芦子叶的 C/N, 在 14 d 至 20 d 均呈下降趋势, 20 d 后均再上升, 但 KT1.0 处理的西葫芦子叶的 C/N 始终比对照高。

2.3 KT1.0 处理对西葫芦子叶花芽构建时 POD 活性的影响

西葫芦子叶的 POD 活性先上升, 20 d 时开始下降 (图 3), 对照和 KT1.0 处理的子叶 POD 活性的峰值均出现在 20 d, 但 KT1.0 处理的 POD 活性更高。

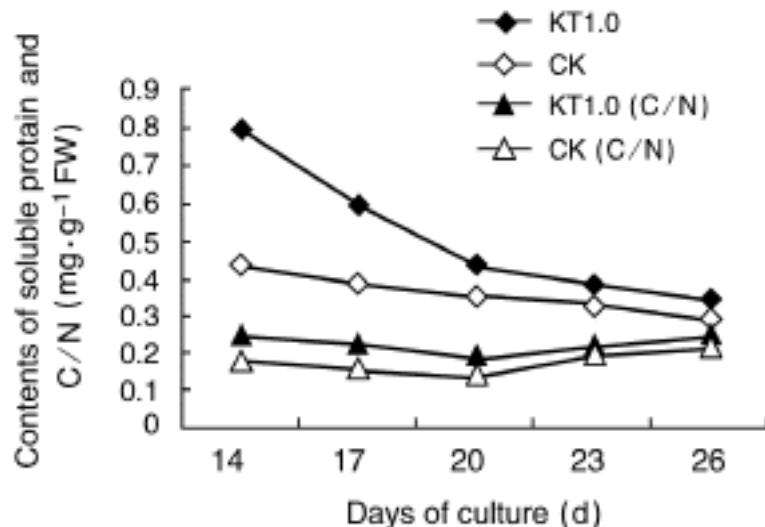


图 2 西葫芦子叶花芽构建时可溶性蛋白质含量、C/N 的变化

Fig. 2 Changes of soluble protein and C/N of cotyledon of *Cucurbita pepo* during floral-bud construction

2.4 KT1.0 处理对西葫芦子叶花芽构建时 DNA、RNA 含量的影响

KT1.0 处理的西葫芦子叶 DNA 含量在 20 d 时有很小的突跃, 在 0.01 水平与对照呈极显著差异 (图 4)。对照的 DNA 含量在花芽构建的整个过程几乎没有峰值出现。KT1.0 处理的子叶 RNA 含量初始值与对照相同, 而后迅速上升, 20 d 达到峰值, 然后又迅速下降, 对照的 RNA 含量上升缓慢, 峰值出现的时间推迟至 23 d, 然后缓慢下降, 二者的峰值相差 2 倍多。

2.5 KT1.0 处理对西葫芦子叶花芽构建时多胺含量的影响

对照基本一致。而 KT1.0 处理西葫芦子叶的可溶性糖含量在花芽构建前后均明显高于对照, 在 14 d 至 20 d 与对照在 0.05 水平上呈显著差异。对照、KT1.0 处理的淀粉含量和可溶性糖含量曲线, 从 14 d 至 20 d 均呈下降趋势, 从 20 d 至 26 d 曲线稳中有升。

2.2 KT1.0 处理对西葫芦子叶花芽构建时可溶性蛋白质含量的影响

对照和 KT1.0 处理西葫芦子叶在花芽构建 (20 d) 前后的可溶性蛋白质含量均下降 (图 2), 说明子叶在花发端过程中起到提供养分的作用。而 KT1.0 处理西葫芦子叶的可溶性蛋白质含量高于对照, 其中

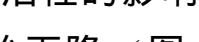


图 3 西葫芦子叶花芽构建时 POX 活性的变化

Fig. 3 Changes of POX activity of cotyledon of *Cucurbita pepo* during floral-bud construction

对照和 KT1.0 处理的西葫芦子叶 DAP 含量 14 d 至 20 d 间下降, 20 d 至 26 d 上升, KT1.0 处理的子叶 DAP 含量大大低于对照 (图 5)。20 d 后 Cad 开始出现并逐渐上升, KT1.0 处理的子叶 Cad 含量在 0.01 水平与对照呈极显著差异, 明显低于对照。

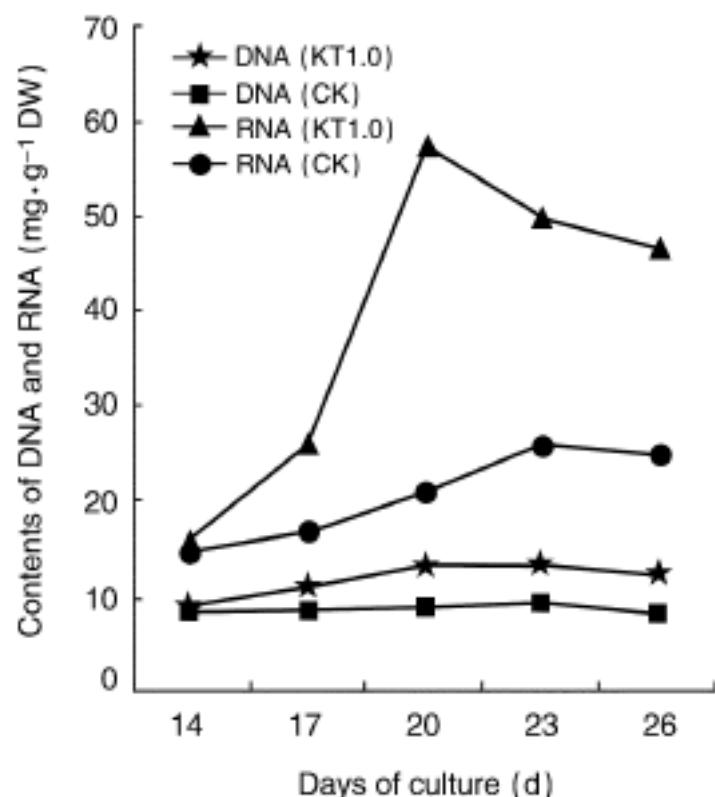


图 4 西葫芦子叶花芽构建时 DNA、RNA 含量的变化

Fig. 4 Changes of DNA and RNA of cotyledon of *Cucurbita pepo* for floral-bud construction

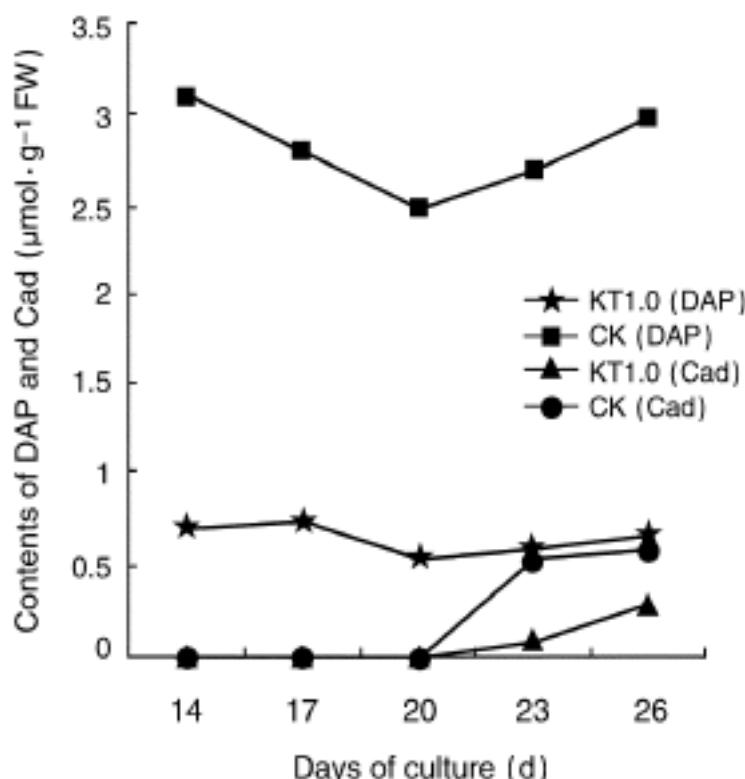


图 5 西葫芦子叶花芽构建时内源 DAP、Cad 含量的变化

Fig. 5 Changes of endogenous DAP and Cad of cotyledon of *Cucurbita pepo* for floral-bud construction

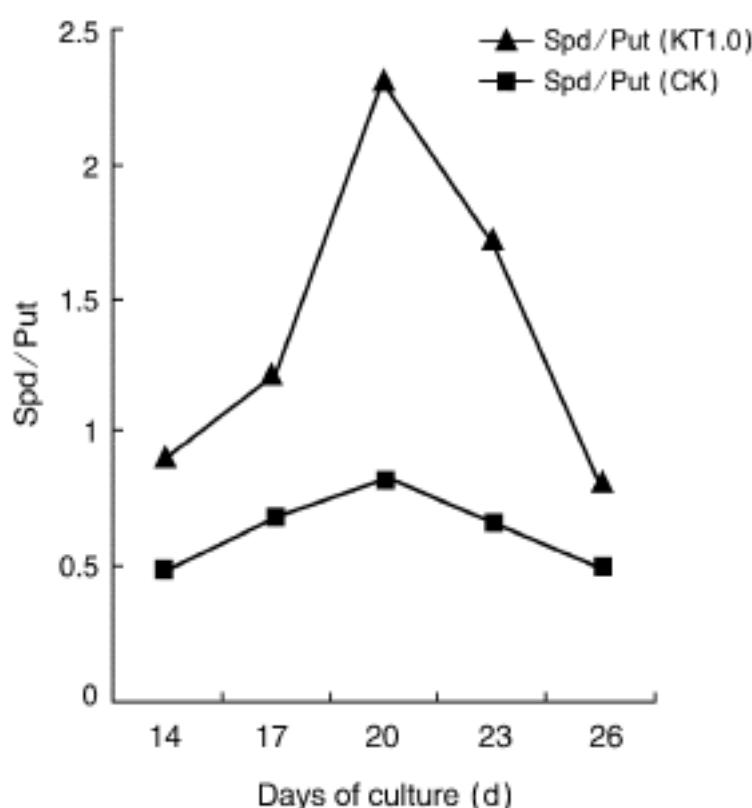


图 6 西葫芦子叶花芽构建时 Spd Put 的变化

Fig. 6 Changes of Spd Put of cotyledon of *Cucurbita pepo* for floral-bud construction

植物生长发育的调节往往是多种激素综合作用的结果 (Young 等, 1983), 这种作用取决于各激素本身的浓度和适当配比, 为此, 检测了内源 Spd Put 来分析它们与花芽构建的关系 (图 6), 对照和 KT1.0 处理的西葫芦子叶 Spd Put 值均先上升、后下降, 20 d 出现突跃, KT1.0 处理的子叶 Spd Put 峰值超过对照 3 倍。

3 讨论

花芽构建是花各功能结构分化和花器官的形成过程, 需要大量的营养物质和能量供应 (任红旭等, 1999 a, b)。西葫芦子叶在花芽构建时可溶性蛋白质和可溶性糖含量均呈下降趋势, 表明子叶担负了物质、能量的贮备和供应作用 (图 1, 2), 而 KT1.0 处理的可溶性蛋白质和可溶性糖含量曲线下降更

快，说明 KT1.0 诱导下的子叶贮备和提供了更多的可溶性物质满足花器官形成的生理需要。在花芽构建的后期（20 d 至 26 d），可溶性糖含量稍有上升，估计是不定芽及绿色子叶的少量光合作用所致。淀粉含量变化的曲线始终较平稳，说明分子量大、非溶解性的淀粉仅作为一种能源的贮备形式存在于子叶，真正对西葫芦子叶花芽构建发挥功能作用的应用是溶解态的、小分子的、可运输、可重构的物质（李凤玉等，2001），KT1.0 诱导使可溶性蛋白质和可溶性糖含量明显高于对照、而对淀粉的影响较小，也反映了这一事实。这与黄瓜子叶花芽分化研究的结论基本一致（任红旭等，1999 a, b）。

14 d 正是西葫芦子叶离体培养的花蕾发端期，较高的 C/N 可能作为一种恰当比例的营养基础，提供给花蕾的形态建成。20 d 后 C/N 再度上升，可能对再生株上小花蕾的陆续建成有关。KT1.0 处理的西葫芦子叶的 C/N 始终比对照高，花芽出现的频率也比对照高得多（黄作喜等，2001），正说明较高的 C/N 有利于花芽的构建，与开花的碳氮比理论相符合。

多胺是一类低分子的脂肪族含氮碱，存在于多种植物的生物活性物质，主要包括 Spm（精胺）、Spd、Agm（鲱精胺）、Put、Cad 等 5 种，Young 和 Galston（1983）及 Hung 等（1983）对多胺进行了系统研究，认为在刺激植物生长发育和防止衰老过程中多胺类似 Ca^{++} -调节蛋白、通过 cAMP 起到了“第二信使”作用，细胞分裂活跃的部位其合成作用较旺盛。图 5 表明，DAP 含量先下降后上升，DAP 是 Spd 的代谢产物，分析认为是 Spd 的分解作用在花芽构建前较弱，然后随子叶衰老而加强，20 d 后 Cad 出现并升高，因多胺合成的前体物质之一赖氨酸的分解可形成 Cad，说明 Spd 合成的前体物质赖氨酸在花芽构建后分解加强，由此推测 Spd 含量在花芽构建前、后应呈现先升、后降的趋势，又因 Put 是 Spd 合成的直接前体，起始物质精氨酸和赖氨酸经脱羧酶作用先行合成 Put，Put 接受蛋氨酸提供的丙氨基逐步形成 Spd（潘瑞炽，2001），Spd 上升的结果势必导致 Put 含量下降和 Spd/Put 上升，图 6 显示与之完全相符。KT1.0 处理可能抑制子叶细胞的 Spd 降解、DAP 含量显著低于对照，同时抑制赖氨酸分解、Cad 含量低于对照（图 5），使 Spd/Put 水平在花芽构建前后均高于对照，在花芽构建时差别最为明显（图 6）。Kaur-Sawhney 等（1993）研究认为外施激动素可促进植物细胞内的 Spd/Put 提高，有利于植物花芽分化，并发现在花芽分化时，Spd 结合于一种相对分子量为 1.8×10^3 的多肽，Spd 与多肽结合导致花芽形成，在成花中的作用可能在于促进花器官的持续发育。本实验也表明，KT1.0 可诱导西葫芦子叶花芽分化率比对照提高 41%。

KT1.0 处理可促进西葫芦子叶的 RNA 含量迅速跃升，峰值出现的时间与花芽构建正好一致，对照的 RNA 含量较低，且峰值出现的时间比 KT1.0 处理推迟，与实验显示的对照的花芽分化延迟、分化频率低相一致。KT1.0 处理对西葫芦子叶的 DNA 含量影响较小，说明外施 KT 主要调控细胞内遗传信息的转录合成作用（杜勤等，2000）。

KT1.0 处理西葫芦子叶的 POD 活性在花芽构建前后均超过对照，其高峰期与花芽构建开始时间相吻合（图 3）。黄瓜子叶培养花芽分化的资料表明，POD 活性的提高可能是细胞进入组织分化的前奏，其活性变化可能与花芽构建有关（庞基良等，2002）。

许多研究表明多胺具有调控核酸、蛋白质代谢、改变 DNA 核型、抑制核酸酶等作用（Hung 等，1983），从本实验的结果结合黄瓜子叶花芽分化的研究也可看出，多胺在外源激素和细胞内花芽构建的生理响应之间起到了“第二信使”的作用，高水平的 Spd/Put 可

能控制着花芽构建有关基因的转录启动，转录 RNA 在花芽构建启动中起到了关键作用（陈以俊和沈惠娟，1999），它通过翻译合成与花芽构建相关的特异蛋白质，或酶（如 POD）的激活，进一步调控碳素、氮素等营养成分的降解、运输，形成花结构。

[参 考 文 献]

李宗霆，周燮，1996. 植物激素及免疫检测技术 [M]. 南京：江苏科技出版社，100—191

潘瑞炽，2001. 植物生理学，第4版 [M]. 北京：高等教育出版社，198—199

Chen YJ (陈以俊), Shen HJ (沈惠娟), 1999. Correlation between endogenous polyamine contents and flower bud formation in *Dianthus chinensis* L. [J]. *Acta Hort Sin* (园艺学报), 26 (5): 341—344

Du Q (杜勤), Jiang WM (姜维梅), Liang HM (梁海曼), et al, 2000. The relationship of floral differentiation and ABP gene expression on cucumber cotyledons cultures [J]. *J Zhejiang Univ* (浙江大学学报), 27 (4): 459—463

Huang ZX (黄作喜), Shen HJ (沈惠娟), Xie YF (谢寅峰), 2001. Studies on the floral bud differentiation cotyledon of *Cucumber pepo* L. *in vitro* [J]. *J Nanjing Forest Univ* (南京林业大学学报), 25 (6): 14—18

Huang ZX (黄作喜), Shen HJ (沈惠娟), Xie YF (谢寅峰), 2002. The changes of endogenous hormones and polyamines of the cotyledons of *Cucurbita pepo* L. *in vitro* during floral bud differentiation [J]. *J Nanjing Normal Univ* (南京师范大学学报), 25 (2): 28—31

Hung DT, Marton LT, Deen DF, et al, 1983. Depletion of intracellular polyamines may alter DNA conformation of the rat brain tumor cells [J]. *Science*, 221: 368—370

Jiang WM (姜维梅), Du Q (杜勤), Liang HM (梁海曼), et al, 1998. Observation on the floral primordia formation on the cucumis cotyledons cultured *in vitro* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 20 (1): 76—80

Kaur-Sawhney R, Tibnrcio AF, Galston AW, 1988. Spermidine and flower-bud differentiation in thinlayer explant of tobacco [J]. *Planta*, 173: 282—284

Kaur-Sawhney R, Tibnrcio AF, Galston AW, 1993. Spermidine and flower bud differentiation in thin layer tobacco tissue culture [J]. *Plants*, 173: 282—284

Li FY (李凤玉), Zhang JS (章精设), Liang HM (梁海曼), 2001. The effects of heat shock treatment on the floral formation of cucumber excised cotyledons and the electrophoresis patterns of soluble proteins [J]. *J Zhejiang Univ* (浙江大学学报), 28 (4): 434—438

Pang JL (庞基良), Wang LL (王俐琳), Hu JQ (胡江琴), et al, 2002. Studies the critical period of floral 2, 3, 5-triiodobenzoic acid and paclobutrazol inducing differentiation on *in vitro* cotyledonary nodes of cucumber [J]. *J Hangzhou Teach Coll* (杭州师范学院学报), 19 (2): 47—49

Ren HX (任红旭), Chen X (陈雄), Zhao XJ (赵晓俊), et al, 1999a. Effects of nitrogen nutrition and salicylic acid on floral bud initiation in cucumber cotyledon culture [J]. *Acta Hort Sin* (园艺学报), 26 (2): 105—109

Ren HX (任红旭), Chen X (陈雄), Wang YF (王亚馥), 1999b. Effects of poor nitrogen nutrition and kinetin on floral bud initiation of excised cucumber cotyledons [J]. *J Landrou Univ* (兰州大学学报), 35 (2): 124—129

Young ND, Galston AW, 1983. Putrescine and acid stress [J]. *Plant Physiol*, 71: 767